

IAMC-CNR di Capo Granitola



Ideazione, progettazione e costruzione di un packaging per il kit “FishProfiler DNA Kit”

Marco Fasola, Stefania Russo, Aldo Nicosia, Girolama Biondo, Marcello Tagliavia, Gabriele Galli, Carlo Patti, Isa Maneiro, Marilena Di Natale, Nicola Giaramita, Carmelo Bennici, Marco Torri, Angela Cuttitta.

Istituto per l’Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia

Sommario

1.	Introduzione.....	pag. 3
2.	Materiali e metodi.....	pag. 5
3.	Bibliografia.....	pag. 11
4.	Ringraziamenti.....	pag. 12

1. INTRODUZIONE

All'interno del “PROGETTO NUOVE ROTTE BLUE ECONOMY PO-FESR 2007/2013 SICILIA LINEA DI INTERVENTO 5.1.1.2 PIANO DEGLI INVESTIMENTI INNOVATIVI - Tutela e valorizzazione dei prodotti ittici freschi, di allevamento e trasformati” è stata effettuata una attività di ricerca riguardante l'uso dei marcatori genetici per identificare non solo le specie e/o varietà del pescato, ma anche per individuare caratteri molecolari in grado di risalire alla provenienza e di fornire a produttori e consumatori uno strumento efficace di controllo della qualità di filiera nel rispetto della normativa vigente.

L'attività progettuale, per quanto concerne la messa a punto di metodologie molecolari basate sull'analisi del DNA su specie ittiche, ha raggiunto i seguenti obiettivi:

- 1- Realizzazione di un sistema di analisi finalizzato all'identificazione dei prodotti ittici ai fini di tracciabilità di filiera;
- 2- Realizzazione di un sistema di analisi (*kit*) finalizzato all'identificazione univoca di specie ittiche di rilevanza economica.

In questo scenario è stato messo a punto un metodo veloce di estrazione del DNA. Esso non prevede nessuna fase di purificazione per i prodotti ittici freschi e trasformati e si presta a qualsiasi analisi che preveda l'utilizzo della tecnica PCR. Il protocollo consente l'amplificazione efficiente del DNA da qualsiasi scarto industriale proveniente dalla lavorazione del pesce, indipendentemente dal metodo di conservazione del campione. Pertanto, questa metodica è particolarmente adatta per il processamento veloce dei campioni e consente di effettuare ricerche per l'autenticazione di pesce mediante analisi del DNA (Tagliavia et al., 2016). Tali obiettivi sono stati raggiunti applicando la metodica molecolare del DNA *barcoding* (Arroyave & Stiassny 2014, Galimberti et al., 2013, Mafra et al., 2008, Nicole et al., 2012 e Rasmussen & Morrissey, 2008), che consiste nell'amplificazione di una specifica regione del gene mitocondriale chiamata COI associata ad un sistema di *primer* interni specie specifico a tale regione, che permette l'identificazione univoca delle specie ittiche.

Le specie analizzate sono riportate in elenco:

- sardina (*Sardina pilchardus*);
- sgombero (*Scomber scombrus*);
- orata (*Sparus aurata*);
- pesce spada (*Xiphias gladius*);
- spigola (*Dicentrarchus labrax*);

- gambero rosso (*Aristaeomorpha foliacea*);
- aragosta (*Palinurus elephas*);
- seppia (*Sepia officinalis*);
- calamaro (*Loligo vulgaris*);
- totano (*Todarodes sagittatus*).

Il sistema di reagenti che permettono la realizzazione del sistema di analisi finalizzato all'identificazione dei prodotti ittici, sono allocati in una scatola. Quest'ultima è fornita di un *datasheet* all'interno del quale è riassunto il protocollo di estrazione del DNA totale per l'identificazione delle specie ittiche marine, le informazioni necessarie per effettuare l'amplificazione PCR, il profilo di reazione PCR ed infine uno schema riassuntivo dei risultati attesi per ogni specie analizzata.

Il *datasheet* Fig. 1 è stato archiviato e protocollato (N.0008428 – 18/07/2016)



Fig. 1 - *Datasheet*

2. MATERIALI E METODI

Per la realizzazione della scatola sono state effettuate delle prove preliminari per verificare quale fosse la forma e la scocca migliore e più ergonomica.

Come prima prova è stata adattata una scatola di cartone di misura 130x90x120mm all'interno della quale trovavano alloggio il portaprovette da 1,5-2 ml in polistirolo e i due contenitori di reagenti Fig. 2.



Fig.2 – Portaprovette da 1,5-2 ml in polistirolo e contenitori di reagenti

Tale contenitore non è però risultato idoneo per lo scopo finale del prodotto, pertanto si è proceduto ad altre prove.

Si è deciso di costruire una scatola *ad hoc*, utilizzando del cartoncino vegetale dello spessore di 3mm Fig. 3-A. Grazie all'utilizzo di una matita a punta rigida HB2 e una riga di metallo per uso tecnico, sono state disegnate le linee guida per il taglio Fig. 3-B.

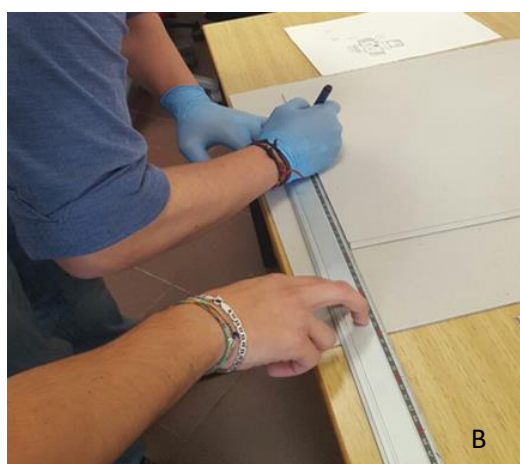
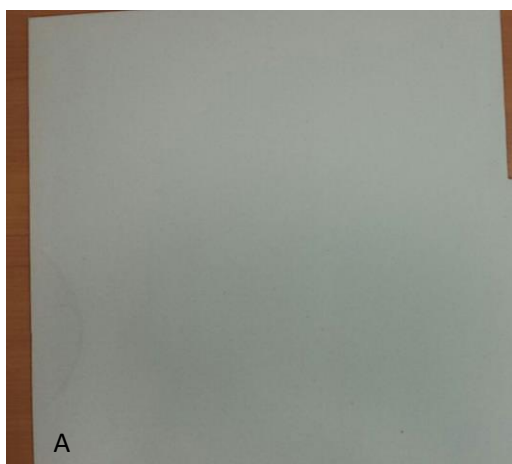


Fig.3-A Cartoncino vegetale; B Fase di disegno sezioni

A questo punto, sono state tagliate delle porzioni per creare la base e la porzione laterale della base della scatola, rispettivamente di misure di misure 180x130mm per la base e 180x25mm per i due lati lunghi e 130x25mm per i due lati corti. Per il taglio oltre all'ausilio della riga di metallo, sono stati utilizzati dei cutter professionali con punte in acciaio intercambiabili Fig. 4-A ed un taglia balsa Fig. 4-B.



Fig. 4-A Cutter professionali; B Fase di taglio con taglia balsa

Una volta pronte le porzioni della base della scatola, queste sono state assemblate utilizzando della colla vinilica, risultando questa il collante più idoneo per il cartoncino vegetale.

Non appena la base incollata si è asciugata ed è risultata pronta, si è proceduto al riempimento della stessa per alloggiare tutti i componenti del kit.

Una prima prova è stata effettuata utilizzando della resina trasparente. Questa è stata versata al suo interno, posizionando i contenitori del kit al suo interno, prima che la resina si asciugasse. Questo metodo ha permesso di modellare la resina su misura di ogni componente del kit, per avere così un alloggio stabile e su misura. Non appena la resina si è rappresa (24h), tutti i componenti sono stati asportati, per verificarne la mobilità e assicurarsi della perfetta allocazione dei vani dei contenitori. La base, a questo punto, è stata visionata dettagliatamente ed è stato riscontrato che la resina non è risultata il materiale più idoneo per questa parte di assemblaggio del kit. La criticità maggiore è stata la sua viscosità al momento della colatura all'interno della base in cartoncino.

Essendo questa molto liquida al momento della colatura, il cartoncino non essendo impermeabile, ha assorbito parte della resina, facendola fuoriuscire nella parte inferiore. Problema simile è stato riscontrato nel porta provette in polistirolo, il quale è stato inglobato dalla resina, rendendone impossibile la rimozione e rendendolo inadatto allo scopo. Altra criticità è stata l'altezza degli alloggi, questi sono infatti risultati insufficientemente alti per mantenere stabili le bottiglie di reagenti.

Alla luce delle problematiche riscontrate, si è proceduto a ricreare la base della scatola modificandone i punti deboli e cambiando il materiale di riempimento interno. Pertanto si è deciso di aumentare le altezze dei bordi contenitivi, tagliando nuovamente dal cartoncino delle porzioni di 195x35mm per i due lati lunghi e 140x35mm per i due lati corti. Queste sono state poi assemblate insieme alla nuova base della misura di 195x140mm, procedendo con la stessa metodica precedentemente descritta.

Il materiale di riempimento selezionato è stato una gomma siliconica, per darne la forma e l'altezza adatta questa è stata prima riversata in un contenitore ritagliato su misura Fig. 5, ciò ha permesso di far asciugare il materiale non a contatto con il cartoncino vegetale.



Fig. 5 - scocca per base in gomma siliconica

Anche in questo caso tutti i componenti del *kit* sono stati posizionati prima che la gomma siliconica si asciugasse, ciò ha permesso di ottenere una maggiore profondità per l'alloggio delle bottiglie di reagenti, così che nel *kit* finale queste risultassero ferme e stabili. È stata inoltre collocata una piccola sezione di cartoncino vegetale tra il porta provette e i reagenti, a questa è stata assicurata anche una piccola sezione di adesivo per facilitarne l'estrazione al termine dell'asciugatura. Una volta estratto il cartoncino da questa posizione, ciò che ne risulta è un piccolo vano stretto e sottile, ottenuto per il posizionamento del libretto illustrativo.

Non appena la gomma siliconica è risultata idonea all'asportazione dal contenitore in plastica (24h), sono stati asportati bottigliette, porta provette e cartoncino per vano libretto. Il porta provette in polistirolo però anche in questo caso ha presentato le stesse criticità delle prime prove, incollandosi alla gomma siliconica e rompendosi durante la fase di asportazione, pertanto è stato deciso di asportare tutto il materiale in polistirolo dal vano e utilizzare successivamente un porta provette in cartone. La base è stata poi posizionata all'interno della base della scatola, risultando perfettamente aderente e di uguale altezza.

I vani al suo interno sono quindi risultati:

- 2 di forma cilindrica diametro 5 cm e profondi 2,2 cm
- 1 di dimensioni 9.5 cm X 0.3 mm, profondo 2,2 cm
- 1 di dimensioni 8.3 cm X 10 cm, profondo 2.2 cm

La decisione di utilizzare un porta provette in cartoncino piuttosto che in polistirolo, ha portato ad una nuova problematica, ossia la differenza di dimensioni tra i due, creando quindi la necessità di adattare il nuovo di misura 65x9mm al vano che era stato prodotto per il vecchio porta provette di misura superiore. La soluzione finale è stata quella di allocare il nuovo porta provette all'interno del vecchio vano e riempire il vuoto attorno con del materiale plastilino Fig. 6.

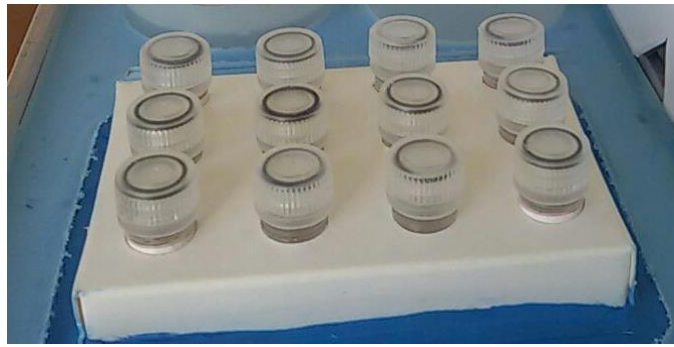


Fig. 6 - Porta provette con plastilina

La fase successiva è stata il taglio e l'assemblaggio del coperchio. La metodologia e i materiali utilizzati sono gli stessi adoperati per l'assemblaggio della base, modificando solo la misura dell'altezza 110mm e la metodologia di incollaggio delle parti. A differenza della base sono state incollate sul bordo esterno della faccia superiore del coperchio, valutando così l'ingombro del fondo.

Per garantire un'apertura più ergonomica del coperchio, sono stati effettuati dei tagli sulle due facce laterali. Questi sono stati effettuati a circa 10 cm sul bordo inferiore ed è stata scelta la forma triangolare, di modo che tendendo con una mano il coperchio e con l'altra la base, da queste aperture si potesse trattenere la parte inferiore della scatola Fig. 7.



Fig. 7 - Tagli laterali alloggio dita

Completata la scocca della scatola, questa è stata rivestita con della carta adesiva di colore bianco, il foglio è stato tagliato su misura, utilizzando un *cutter* e una riga millimetrata. Per incollare le sezioni tagliate è stata utilizzata una riga per accompagnare il foglio durante la fase di stesura, in



Fig. 10 - *Kit* completo

3. BIBLIOGRAFIA

- Arroyave, J., & Stiassny, M. L. J. (2014). DNA barcoding reveals novel insights intopterygophagy and prey selection in distichodontid fishes (Characiformes:Distichodontidae). *Ecology and Evolution*, 4(23), 4534–4542.
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., et al. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International.*, 50, 55–63.
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. O. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–665.
- Nicolé, S., Negrisolo, E., Eccher, G., Mantovani, R., Patarnello, T., Erickson, D. L., et al. (2012). DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 387.
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 280–295.
- Tagliavia, M., Nicosia, A., Salamone, M., Biondo, G., Bennici, C. D., Mazzola, S., Cuttitta A. Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification. *Food Chemistry* 203 (2016) 375–378.

4. RINGRAZIAMENTI

- Project "Nuove Rotte: Blue Economy" Piano Sviluppo di Filiera PO FESR Sicilia 2007/2013 – Obiettivo Operativo 5.1.1, Linea d'intervento. TUTELA E VALORIZZAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI FRESCHI, DI ALLEVAMENTO E TRASFORMATI 5.1.1.2.
- Project Bandiera RITMARESP2_WP4_AZ2_UO04_D06. A. Cuttitta.
- Project: "Tecnologie e processi per il miglioramento della shelf-life dei prodotti del comparto agroalimentare attraverso l'uso di film edibili innovativi a base pectinica" ("PON FILMEDIBILI", Cod. PON01_02286 - CUP: B68F12000360007.
- Project: " Sistema di Comunicazione Informazione e Diffusione dell' Osservatorio della Biodiversità della Sicilia". PO FESR 2007/2013 linea di intervento 3.2.1.2 Regione Siciliana - Assessorato Regionale Territorio e Ambiente - Dipartimento Regionale dell' Ambiente Progetto.